

Kalıcı fibrilasyon sürecindeki insan sağ atriyal miyositlerinde apoptotik protein ekspresyonları

Apoptotic protein expressions in human right atrial myocytes with permanent fibrillation

Günseli Çubukçuoğlu Deniz,¹ Serkan Durdu,² Ahmet Rüçhan Akar,² Nalan Akyürek,³
Ömer Akyürek,⁴ Çağın Zaim,² Ümit Özyurda²

¹Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara;

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi ²Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, ⁴Kardiyoloji Anabilim Dalı, Ankara;

³Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı, Ankara

Amaç: Bu çalışmada atriyal fibrilasyon (AF)'un patogenezinde apoptozisin rolü araştırıldı.

Çalışma planı: Mitral kapak cerrahisine alınan ardışık 30 hasta çalışmaya dahil edildi. Kalıcı AF'si olan 11 hasta (6 erkek, 5 kadın; ort. yaş 57.7±13.1 yıl; dağılım 36-76 yıl) AF grubunu, normal sinüs ritmindeki 19 hasta (11 erkek, 8 kadın; ort. yaş; 64.1±8.4 yıl; dağılım 48-77 yıl) ise kontrol grubunu oluşturdu. Ekokardiyografi ile ölçülen ortalama sol atriyum çapı, AF grubundaki hastalarda 54.8±3.4 mm; kontrollerde ise 40.7±4.1 mm olarak belirlendi (p=0.001). Tüm hastalarda sağ atriyal doku örnekleri ekstrakorporeal dolaşıma girilmeden önce alındı. Atriyal dokularda apoptozisin belirlenmesi için TUNEL yöntemi ile in situ DNA fragmentasyon analizi yapıldı. Bunlara ek olarak anti-apoptotik Bcl-2 ve pro-apoptotik Bax proteinleri immünohistokimyasal yöntemle araştırıldı.

Bulgular: Bax ve Bcl-2 protein ifadeleri AF grubu ve kontrollerde benzer oranlarda bulundu (sırasıyla ortalama, %16.2'ye karşın %15.1, p=0.73; %14.6'ya karşın %16.1, p=0.64). Ancak, kontrollerle kıyaslandığında atriyal miyosit apoptozis, AF grubunda anlamlı derecede (sırasıyla, ortalama apoptotik indeks %21.9'a karşın %11.8; p=0.002) yüksek idi. Atriyal dokusu kalıcı AF'den etkilenmiş olan hastaların atriyal miyosit çekirdekleri belirgin şekilde TUNEL pozitifliği gösterirken, kontrol grubundaki hastaların büyük çoğunluğu TUNEL negatif veya düşük yoğunlukta TUNEL pozitifliği paterni sergiledi.

Sonuç: Bu pilot çalışmayla, apoptozisin terminal belirteci olan DNA fragmentasyonu ile AF arasında pozitif ilişki olduğu gösterildi. Bu sonuçlar, kalıcı AF patogenezinde atriyal miyosit apoptozisinin rolü olduğunu düşündürmektedir. Anti-apoptotik hedefli stratejilerin atriyal yeniden biçimlenme ve fibrozisin önlenmesi açısından klinik bir önemi olabilir.

Anahtar sözcükler: Atriyal fibrilasyon; apoptozis; DNA fragmentasyonu.

Background: The aim of this study was to investigate the role of apoptosis in the pathogenesis of atrial fibrillation (AF).

Methods: Thirty consecutive patients submitted for mitral valve surgery were investigated. Eleven patients with permanent AF (6 males, 5 females; mean age 57.7±13.1 years; range 36 to 76 years) were considered as the AF group whereas 19 patients who were in sinus rhythm (11 males, 8 females; mean age 64.1±8.4 years; range 48 to 77 years) were selected as control subjects. Mean left atrial diameter determined by echocardiography was 54.8±3.4 mm in the AF group compared to 40.7±4.1 mm in controls (p=0.001). The right atrial appendage tissue samples were excised before extracorporeal circulation in all patients. We assessed the onset of in situ DNA fragmentation by using the TUNEL assay. Furthermore, we examined the expression pattern of anti-apoptotic Bcl-2 and pro-apoptotic Bax proteins using immunohistochemistry.

Results: Bax and Bcl-2 expression were similar between the AF group and control subjects (16.2% versus 15.1%, p=0.73; 14.6% versus 16.1%, p=0.64, respectively). However, when compared with controls, atrial myocyte apoptosis was significantly higher within the AF group (mean apoptotic index, 21.9% versus 11.8% respectively, p=0.002). Atrial tissue from permanent AF-affected individuals had atrial myocyte nuclei that were positive for TUNEL whereas control subjects had either TUNEL negative or low-grade TUNEL positivity.

Conclusion: This pilot study demonstrated a positive correlation between AF and DNA fragmentation, a terminal determinant of apoptosis. The results suggest a potential link between the pathogenesis of permanent AF and atrial myocyte apoptosis. Targeted anti-apoptotic strategies may have a clinical value by preventing atrial remodeling and fibrosis.

Key words: Atrial fibrillation; apoptosis; DNA fragmentation.

Geliş tarihi: 4 Mayıs 2009 Kabul tarihi: 2 Kasım 2009

Yazışma adresi: Dr. Ahmet Rüçhan Akar. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye, Ankara.
Tel: 0312 - 595 60 54 e-posta: akarruchan@gmail.com

Atriyal fibrilasyon (AF), mitral kapak hastalığı olgularında %60-80 oranında görülen, kapak ameliyatları sonrasında hastaların uzun dönemde yaşam süresini ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir ritim bozukluğudur.^[1,2] Primer kalp hastalığı ortadan kaldırılsa bile ritim bozukluğu çoğunlukla devam edebilmektedir. Son zamanlarda kullanımı giderek artan, mitral kapak cerrahisiyle eş zamanlı uygulanan radyofrekans ablasyon işlemlerinde bile kalıcı sinüs ritminin restorasyonu %76'lar düzeyinde kalmaktadır.^[3] Atriyal fibrilasyona neden olduğu düşünülen veya AF sürecinde meydana gelen hücresel değişimlerden biri de atriyal miyositlerin programlı hücre ölümüdür.

Apoptozis; inflamatuvar bir yanıtı tetiklemeden hücre ölümünü kontrol eden bir sinyal kaskadının aktifleştiği, çok iyi regüle edilen ve evrimsel olarak korunmuş, enerji bağımlı bir "hücre intiharı" programıdır.^[4] Bu program, normal doku gelişimi sırasında ihtiyaç duyulmayan yapıların uzaklaştırılması ve dokunun şeklini alabilmesi için çalışır. Ayrıca yetişkin organizmalarda, hücresel hasarlara yanıt olarak, hasar görmüş hücrelerin çevre dokuya zarar verilmenden uzaklaştırılması için de aktive olur. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla çeşitli kalp ritim bozuklukları ile apoptozis ilişkilendirilmiştir.^[5-9] Bu çalışmaların sonuçlarından da anlaşılacağı gibi fokal sessiz bir apoptotik odak, tıpkı nekrotik hücreler gibi ileti sistemini etkileyerek aritmi veya bloklara yol açabilmektedir.

Çalışmamızın amacı, AF patogenezinde apoptozisin rolü olup olmadığını araştırmaktır. Bu amaçla mitral kapak hastalığı nedeniyle cerrahi tedavi endikasyonu bulunan, kalıcı AF hastaları ile normal sinüs ritimli hastalardan alınan sağ atriyal doku örneklerinde, apoptozisin terminal belirteci olan DNA (Deoksiribonükleik asit) fragmantasyonu ve programlı hücre ölümünün mitokondriyal yolağını regüle eden pro- ve anti-apoptotik Bcl-2 ailesi proteinleri karşılaştırılmıştır.

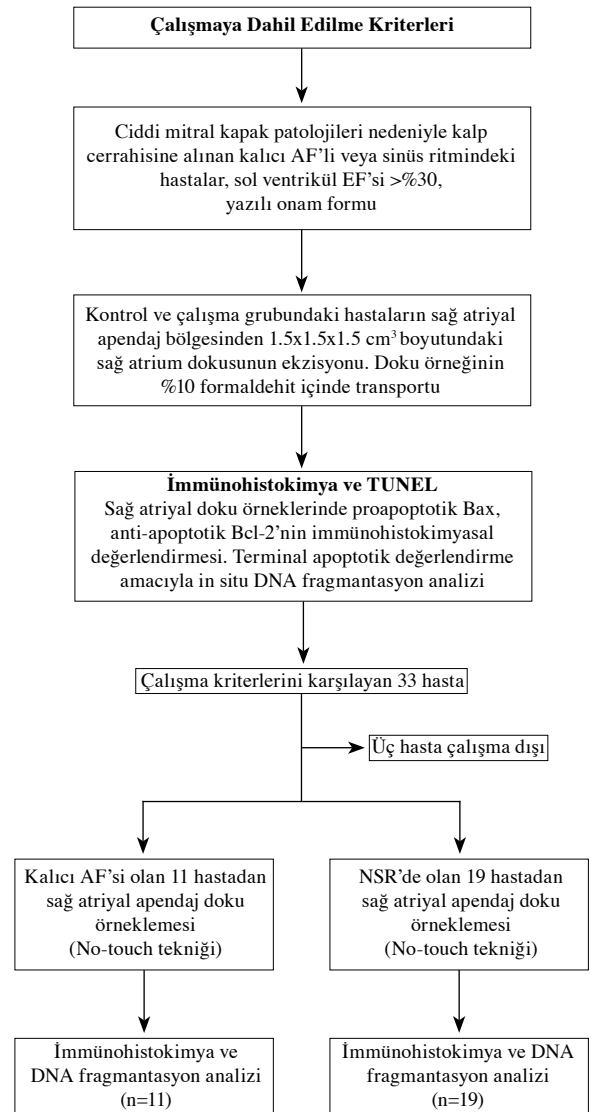
HASTALAR VE YÖNTEMLER

Hasta Kohortu

Hastaların çalışmaya dahil edilme kriterleri; ciddi mitral kapak patolojileri nedeniyle kalp cerrahisine alınan hastalarda kalıcı AF veya normal sinüs ritmi olarak belirlendi. Çalışmadan dışlanma kriterleri ise; (i) kontrol grubu için daha önceden geçirilmiş paroksizmal AF ya da atriyal flutter öyküsü, (ii) ikinci ya da üçüncü derece kalp bloğu varlığı, (iii) kronik böbrek yetmezliği, (iv) sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonunun (SVEF) %30'un altında olması, (v) dilate kardiyomiyopati, (vi) otoimmün hastalık, (vii) Hepatit B virüs (HBV) ve Hepatit C virüs (HCV) enfeksiyonu, geçirilmiş tüberküloz enfeksiyonu, (viii) inflamatuvar yanıtı neden olan vaskülit, miyokardit, infektif endokardit gibi patolojiler, (ix) geçirilmiş ya

da mevcut malignite öyküsü, (x) Wolff-Parkinson-White, Brugada sendromu gibi genetik orijinli hastalıklar ve (xi) hastanın yazılı onam vermemesi olarak belirlendi. Çalışma, Ankara Üniversitesi Etik Kurulu'ndan alınan izin sonrası başlatıldı. Çalışmaya katılan tüm hastalardan ameliyat ve örnekleme öncesinde bilgilendirilmiş onam formu alındı (Şekil 1).

2 Ocak 2008 - 15 Eylül 2008 tarihleri arasında ameliyata alınan 30 hasta çalışmaya dahil edildi. Kalıcı AF'si olan 11 hasta (6 erkek, 5 kadın; ort. yaş 57.7±13.1 yıl; dağılım 36-76 yıl) çalışma grubunu oluştururken, normal sinüs ritmindeki 19 hasta (11 erkek, 8 kadın; ort. yaş 64.1±8.4 yıl; dağılım 48-77 yıl) kontrol grubunu oluşturdu (p=0.116). Atriyal fibrilasyon grubundaki hastaların ortalama sol atriyum çapı 54.8±3.4 mm iken kontrol grubundaki sinüs ritimli hastaların ortalama sol atriyum



Şekil 1. Çalışmanın akış diyagramı. DNA: Deoksiribonükleik asit; AF: Atriyal fibrilasyon; NSR: Normal sinüs ritmi.

Tablo 1. Ameliyat öncesi demografik özellikler

Değişkenler	Atriyal fibrilasyon grubu (n=11)				Kontrol grubu (n=19)				p
	Sayı	Yüzde	Ort.±SS	Min.-max.	Sayı	Yüzde	Ort.±SS	Min.-max.	
Yaş			57.7±13.2	36-76			64.1±8.4	48-77	0.116
Cinsiyet (Erkek)	6	54.5			11	57.9			0.579
Vücut yüzey alanı (m ²)			1.8±0.2	1.5-2.1			1.8±0.2	1.6-2.3	0.503
Hipertansiyon	5	45.5			12	63.1			0.454
Diyabet	1	9.1			3	15.8			0.530
Hiperkolesterolemi	4	6.4			10	52.6			0.466
Sigara kullanımı	3	27.3			9	47.4			0.442
Periferik damar hastalığı	1	9.1			2	10.5			0.702
Kronik obstrüktif akciğer hastalığı	3	27.3			6	31.6			1.000
NYHA sınıflaması			2.5±0.5				3.2±0.4		0.490
Medikasyon									
Aspirin	4	36.4			12	63.1			0.257
ACE inhibitörü/ARB	8	72.7			10	52.6			0.442
Diüretik loop diüretik veya tiazidler	3	27.3			4	21.1			0.515
Beta-adrenoseptör antagonistleri	7	63.6			14	73.7			0.687
Digitalis	2	18.2			1	5.3			0.537
Warfarin	4	36.4			0				0.012
Kalsiyum kanal blokeri	3	27.3			3	15.8			0.641
Amiodaron	2	18.2			1	5.3			0.537
EuroSCORE*			7.7±3.2	5-15			5.3±4.4	0-16	0.127

Ort.±SS: Ortalama±standart sapma; NYHA: New York Heart Association; ACE: Anjiyotensin converting enzyme; ARB: Anjiyotensin reseptör blokeri; Sayısal değişkenler median (interquartile range: IQR) olarak ifade edilip Mann-Whitney U-testi ile karşılaştırılmıştır. Kategorik değişkenler gruptaki hasta sayısı ve yüzde değeri olarak ifade edilmiştir. Kategorik değişkenlerden hiperlipidemi ve aspirin kullanımı açısından gruplar arasında farklılık olup olmadığı "Pearson Ki-kare testi" ile, diğer kategorik değişkenlerin sıklığı arasındaki farklılık ise "Fisher exact test" ile değerlendirilmiştir.

çapı 40.7±4.1 mm olarak ölçüldü (p=0.001). Hastaların ameliyat öncesi demografik verileri Tablo 1'de hemodinamik özellikleri Tablo 2'de sunulmuştur.

Ameliyat detayları

Ameliyata alınacak hastalara, ameliyat öncesi pre-medikasyon amacıyla Midazolam (Dormicum® 5 mg/5 ml ampul, Roche, Türkiye) 2 mg i.v, Sefazolin sodyum (Cefamezin® 1000 mg Flakon, Fujisawa-Eczacıbaşı, Türkiye) i.v uygulandı. Genel anestezi amacıyla 5 mg Midazolam i.v, 20 mg Etomidat i.v (20 mg), 500 mcg Fentanyl i.v (Fentanyl®, Janssen-Cilag, Türkiye), %1-1.5 İsofluran inhaler ve 4 lt/dk O₂ kullanıldı. Kardiyopulmoner

bypass (KPB)'a girilmeden önce kontrol ve çalışma grubundaki tüm hastalarda sağ atriya 4/0 polypropilen sütür ile purse-string sütür konulduktan sonra, örnek alınacak dokuyu travmatize etmemek amacıyla minimum manipülasyonla yaklaşık 1.5x1.5x0.5 cm³ boyutlarındaki sağ atriya dokusu eksize edildi. Daha sonrasında eksize edilen sağ atriya dokusu zaman kaybedilmeden immünohistokimyasal inceleme için uygun transport solüsyonuna (%10 formaldehit) aktarıldı. Hastaların demografik, ekokardiyografik, cerrahi patoloji ve cerrahi teknikler ve takiple ilgili tüm verileri, Bilkent Üniversitesi ile birlikte ortak olarak oluşturulan web tabanlı TurkoScore veri tabanına aktarıldı.

Tablo 2. Ameliyat öncesi hemodinamik özellikler

Değişkenler	AF grubu (n=11)		Kontrol grubu (n=19)		p
	Ort.±SS	Min.-max.	Ort.±SS	Min.-max.	
Sol atriya çapı (mm)	54.8±3.4	50-60	40.8±4.2	35-48	0.001
Ortalama TA (mmHg)	79.6±6.4	66.6-86.6	86.4±11.5	70-116.6	0.084
Sistolik PAB (mmHg)	40.5±7.4	30-55	39.7±8.9	25-60	0.823
SolVEF, (%)	51.1±10.4	40-68	52.1±10.1	30-68	0.787
SolVDSC (cm)	51.1±8.4	30-59	49.1±8.6	32-66	0.533
SolVSSÇ (cm)	32.8±7.6	24-49	32.6±9.7	21-51	0.957
Kalp hızı (atım/dk)	90.5±16.6	71-130	91.6±13.7	58-112	0.855

AF: Atriyal fibrilasyon; TA: Arteriyel tansiyon; PAB: Pulmoner arter basıncı; SolVEF: Sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu; SolVDSC: Sol ventrikül diyastol sonu çapı; SolVSSÇ: Sol ventrikül sistol sonu çapı; Sayısal değişkenler median (interquartile range: IQR) olarak ifade edilip Mann-Whitney U-testi ile karşılaştırılmıştır.

İn situ DNA fragmentasyon analizi (TUNEL)

Kardiyak dokularda in situ DNA fragmentasyonu, TdT-(terminal deoksiniükleotidil transferaz) aracılı floresan-dUTP işaretleme (TUNEL) yöntemiyle belirlendi.^[10] TUNEL, üreticinin talimatlarına göre ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis detection kit (S7110, Chemicon International, Inc., Temecula, CA, USA) kullanılarak uygulandı. Apoptotik hücrelerin görüntülenmesi için peroksidaz substrat 3,3-diaminobenzidin kullanıldı. Nükleer boyama için methyl green (%0.5) kullanıldı. TUNEL-pozitif hücreler ışık mikroskobu (Olympus, Bx51, Japan) altında görüntüldü. TUNEL-pozitif hücreler sayıldıktan sonra her kardiyak dokudaki apoptotik hücrelerin oranı, toplam kas hücre çekirdek sayısına göre hesaplandı.

İmmünohistokimya

Sağ atriyal dokulardan alınan örnekler %10 formaldehitte fikse edildikten sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler 56 °C'lik etüvde deparafinize edildi. Endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksitte 10 dk süre ile bekletildi. Fosfat buffer solüsyonu ile yıkandıktan sonra 0.01 M sodyum sitrat buffer (pH 6.0) içinde toplam 20 dk süre ile mikrodalga fırında işleminden geçirildi. İmmünohistokimyasal boyama streptavidin-biyotin peroksidaz yöntemi kullanılarak yapılır. Kesitler Bcl-2 (klon bcl2/100/D5, kullanıma hazır, NeoMarkers, USA) ve Bax (klon 2D2, NeoMarkers, USA) ile oda sıcaklığında iki saat süre ile inkübe edildi. Renk vererek görüntülemeyi sağlamak amacıyla 3-amino-9-etilkarbazol (AEC, LabVision, NeoMarkers) ile 10 dk süre ile inkübe edildi. Kesitler Mayers hematoksilen ile zemin boyaması yapılarak kapatıldı. Ayrıca primer anti-korun uygulanmadığı negatif kontrol boyama yapıldı.^[10] İmmünohistokimyasal incelemeler gruplara iki gözlemci tarafından miyositlerin yoğun olarak izlendiği rastgele beş mikroskobik alan taranarak yapıldı. Pozitif doku kontrolü olarak tonsil kullanıldı. Bcl-2 ve Bax ile %10'dan fazla sitoplazmik boyanma gösteren miyositler pozitif olarak kabul edildi.

İstatistiksel analiz

Değerlendirmeler SPSS 16.0 versiyon istatistik programı (SPSS Inc; Chicago, Illinois, USA) kullanılarak yapıldı. Sayısal değişkenler median (interquartile range: IQR) olarak ifade edildi ve Mann-Whitney U-testi ile karşılaştırıldı. Kategorik değişkenler gruptaki hasta sayısı ve yüzde değeri olarak ifade edildi. Kategorik değişkenlerden hiperlipidemi ve aspirin kullanımı açısından gruplar arasında farklılık olup olmadığı "Pearson Ki-kare testi" ile, diğer kategorik değişkenlerin sıklığı arasındaki farklılık ise "Fisher's exact test" ile değerlendirildi, p<0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Atriyal fibrilasyon grubunda bulunan hastaların altısına mekanik bileaflet protezin kullanıldığı mitral kapak replasmanı, triküspid ring annuloplasti ve bu hastaların dördüne irrigasyonlu monopolar kateter aracılığıyla radyofrekans ablasyon (RFA) işlemi yapıldı. Radyofrekans ablasyon uygulanan hastalar, ameliyat sırası süreçte başlanan amiodaron (900 mg/24 saat) infüzyonu aldı. Bu hastaların tamamı sinüs ritmi ile taburcu edilmiş idi. Sol ventrikül çıkım yolu gradienti olan (peak gradient 140 mmHg) bir hastaya tekrar ameliyatla mekanik kapak kullanılarak mitral ve aort kapak replasmanı yapıldı. Bu hastada KPB'den ayrılma döneminde gelişen A-V tam blok nedeniyle A-V sequential pacemaker gereksinimi oldu. Ameliyat sonrası 10 günlük bekleme süresi sonrasında A-V tam bloğu düzelmeyen hastaya kalıcı pil implantasyonu yapıldı. Yine AF grubundaki üç hastaya koroner bypass ile eş zamanlı mitral kapak onarım işlemi (ring annuloplasti) uygulandı. Atriyal fibrilasyon grubundaki hastaların hiçbirinde hastane mortalitesi olmadı.

Çalışmamızda kalıcı AF'li hastaların sağ atriyal doku örneklerinde apoptozis araştırmasında kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde DNA kırıkları TUNEL yöntemi ile gösterildi. Hastaların ameliyat öncesi karakteristikleri açısından değerlendirilmesinde iki grup arasında AF ve sol atriyum çaplarından (sol atriyum çapı çalışma grubunda 54.8±3.4; kontrol grubunda 40.7±4.1, p=0.001) başka farklılık tanımlanmadı. Kontrol ve çalışma grubundaki hastaların olası apoptotik sonuçlar üzerinde etkili olan özellikleri Tablo 3'de özetlenmiştir.

Bcl-2 Protein ifadesi

Apoptozis oluşumunu önleyici etkisi olan anti-apoptotik Bcl-2 protein ifadesinin kontrol grubunda ekspresyon oranı %16.1 iken AF grubunda %14.6 oranındadır (p=0.64). Bcl-2 ekspresyonu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkta değildir. Bu farklılık pro-apoptotik Bax ekspresyonu ile anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonu arasındaki matematiksel olmayan denge ile ilişkilendirildi. Atriyal fibrilasyon grubundaki Bcl-2 ekspresyonu Şekil 2a'da, kontrol grubundaki Bcl-2 ekspresyonu Şekil 2b'de gösterilmiştir.

Bax protein ifadesi

Pro-apoptotik Bax protein ekspresyonunun AF grubunda %16.2 oranında olduğu tespit edilirken kontrol grubunda %15.1 oranında olduğu belirlendi (p=0.73). Atriyal fibrilasyon grubundaki Bax ekspresyonu Şekil 2c'de, kontrol grubundaki Bax ekspresyonu Şekil 2d'de gösterilmiştir.

İn situ DNA fragmentasyon analizi (TUNEL) bulguları

Deoksiribonükleik asit kırıklarının saptanması bir hücrenin apoptozise gittiğinin önemli bir biyokimyasal kanıtı olduğundan hem normal sinüs ritimli, hem de AF'li hastalardan alınan doku kesitlerinde DNA kırıklarının varlığı TUNEL yöntemi ile araştırıldı. Bu araştırma sonucunda; AF'li hastalardan alınan kesitlerde TUNEL pozitif hücrelerin %21.9 oranında olduğu, kontrol grubunda ise bu oranın %11.8 olduğu hesaplandı (p=0.002). Atriyal fibrilasyonlu hastalar belirgin şekilde uniform olarak apoptozisin terminal belirteci olan TUNEL pozitifliği gösterirken, kontrol grubundaki hastaların büyük çoğunluğu (n=11) TUNEL negatif, geri kalanlar düşük yoğunlukta TUNEL pozitifliği paterni sergiledi. Atriyal fibrilasyon grubu örneğinde TUNEL pozitifliği Şekil 2e'de izlenirken kontrol grubundaki kesitte TUNEL reaksiyonunun olmadığı Şekil 2f'de izlenmektedir. TUNEL pozitifliğinin sadece bazı hü-

relerde olması ve hücrelerin çekirdeği ile aynı yerde görülmesi (Şekil 2e), elde edilen sonucun özgünlüğünü göstermektedir. Çalışma ve kontrol grubunda tespit edilen TUNEL oranları Şekil 3'te ifade edilmiştir.

TARTIŞMA

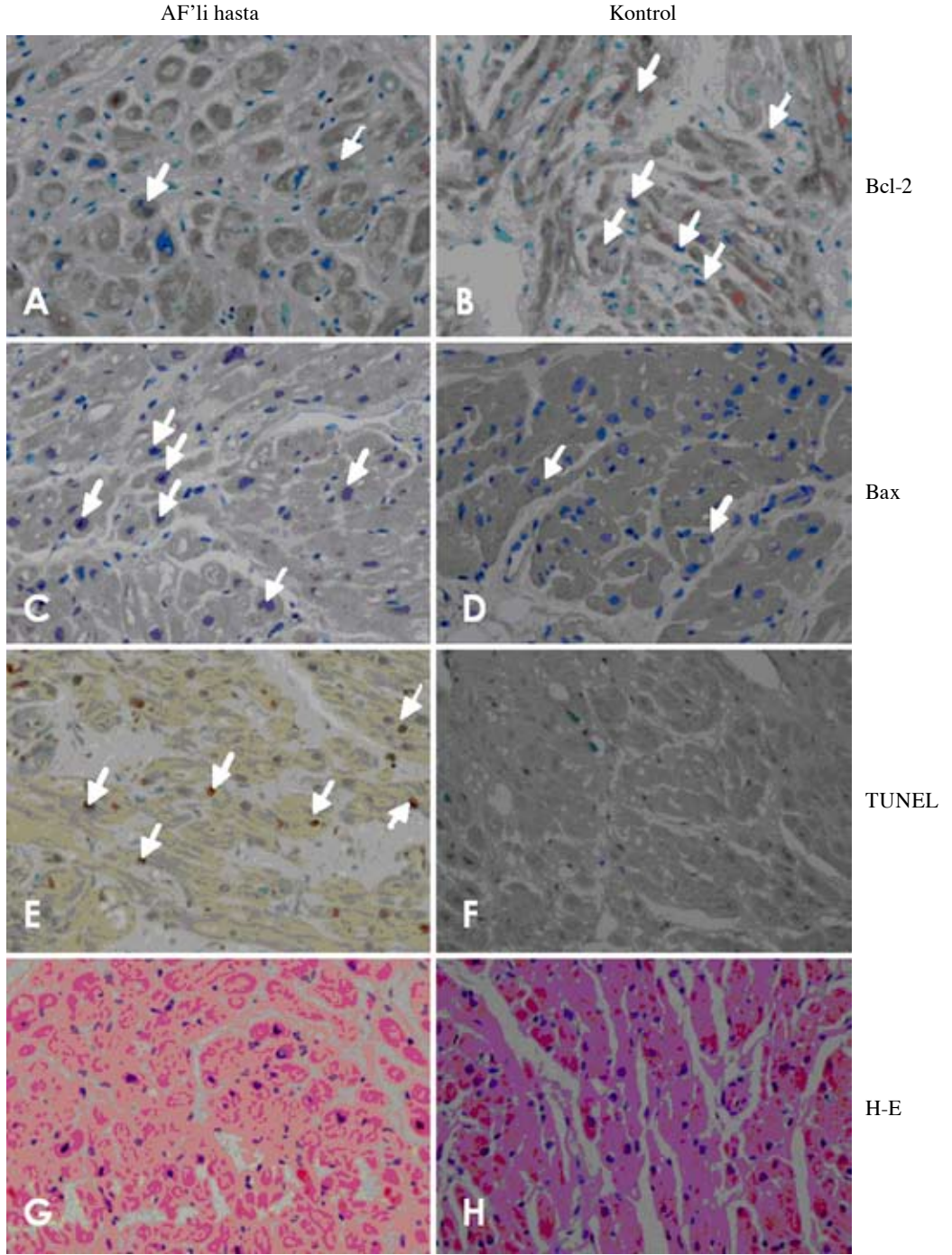
Apoptozisin araştırıldığı bu çalışmada, kalıcı AF'li hastaların sağ atriyal doku örneklerinde, kontrol grubuyla yapılan karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı düzeyde DNA kırıkları TUNEL yöntemi ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, kalıcı AF'si olan hastaların sağ atriyal doku kesitlerinde normal sinüs ritimli hasta kesitlerine göre, immünohistokimyasal yöntemlerle pro-apoptotik Bax protein ekspresyonunun artma eğiliminde ve anti-apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunun azalma eğiliminde olduğu gösterildi. Ancak bu artma/azalma eğilimleri arasında istatistiksel farklılık tespit edilemedi.

Atriyal fibrilasyon, sıklıkla paroksizmal formundan daha inatçı ve kalıcı formuna progresif olarak ilerler. Wijffels ve ark.^[11] keçi modeli aracılığıyla

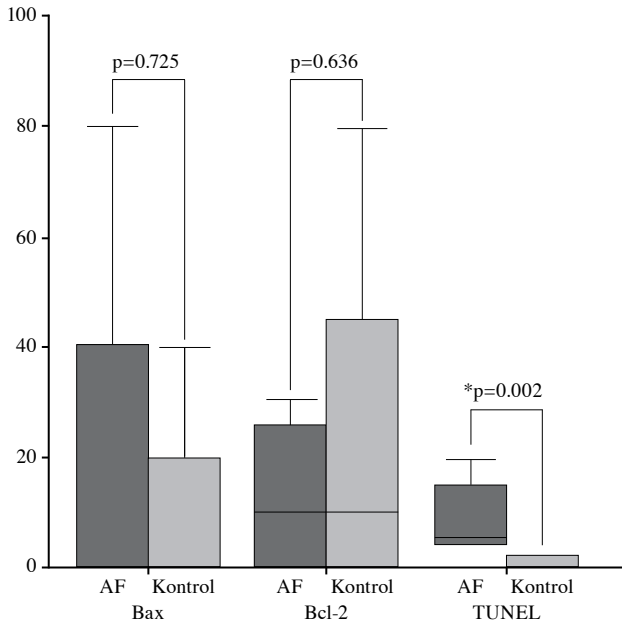
Tablo 3. Hastaların klinik ve apoptotik süreçle ilgili verileri

Hasta	Yaş/cinsiyet	Ritim (süre, ay)	Tanı	EF (%)	SolA çap (mm)	Bax (%)	Bcl-2 (%)	TUNEL (%)
AF-1	41/E	AF (12)	MD	40	57	0	0	0
AF-2	52/E	AF (60)	MY+TY	50	56	0	0	20
AF-3	68/K	AF (36)	MY+ASKH	50	53	10	80	0
AF-4	65/E	AF (48)	MD+TY	45	52	0	0	5
AF-5	60/E	AF (1)	MD	50	50	70	30	3
AF-6	36/E	AF (24)	MY+AY	65	52	20	10	10
AF-7	44/K	AF (60)	MD	68	60	0	0	5
AF-8	71/K	AF (36)	MY+ASKH	48	57	80	20	20
AF-9	67K	AF (24)	MD+ASKH	40	60	60	30	5
AF-10	76/E	AF (24)	MD+TY	40	52	0	10	10
AF-11	55/K	AF (16)	MD+TY	65	54	0	0	20
K1	77/K	NSR	MY+ASKH	55	42	40	70	1
K2	58/K	NSR	MY+ASKH	60	46	0	0	0
K3	74/E	NSR	MY+ASKH	65	44	0	0	0
K4	73/E	NSR	ASKH	55	41	20	30	2
K5	74/E	NSR	MY+TY	40	38	0	5	0
K6	65/E	NSR	ASKH	60	40	0	0	0
K7	54/K	NSR	ASKH	55	44	20	10	0
K8	58/E	NSR	ASKH	50	35	0	60	1
K9	52/K	NSR	MY+TY	68	48	0	0	0
K10	71/E	NSR	ASKH	55	37	60	80	0
K11	68/E	NSR	ASKH	40	35	20	80	0
K12	64/E	NSR	ASKH	50	36	10	20	0
K13	70/E	NSR	ASKH	45	43	20	60	1
K14	53/K	NSR	MY+TY	66	47	20	30	0
K15	64/K	NSR	ASKH	40	45	10	20	5
K16	69/K	NSR	ASKH	45	35	0	0	0
K17	64/E	NSR	ASKH	30	41	0	0	2
K18	62/E	NSR	ASKH	55	38	0	0	5
K19	48/K	NSR	ASKH	55	40	0	0	5

EF: Ejeksiyon fraksiyonu; AF: Atriyal fibrilasyon; K: Kontrol; SolA: Sol atriyum; MD: Mitral darlığı; TY: Tiküspid yetmezliği; ASKH: Aterosklerotik kalp hastalığı; MY: Mitral yetmezliği; NSR: Normal sinüs ritmi.



Şekil 2. Atriyal fibrilasyon ve kontrol grubuna ait immünohistokimya ve TUNEL görüntüleri. **(a)** Atriyal fibrilasyonlu bir hastanın sağ atriyal kardiyomiyositlerinde sitoplazmik Bcl-2 ekspresyonu (AEC x 400). **(b)** Normal sinüs ritimli bir hastanın sağ atriyal kardiyomiyositlerinde yaygın sitoplazmik Bcl-2 ekspresyonu (AEC x 400). **(c)** Atriyal fibrilasyon grubu örneğinde sağ atriyal kardiyomiyositlerde yaygın sitoplazmik pro-apoptotik Bax protein ekspresyonu (AEC x 400). **(d)** Normal sinüs ritimli olgunun sağ atriyal kardiyomiyositlerinde AF olgusuna göre daha az yoğunlukta pro-apoptotik Bax protein ekspresyonu (AEC x 400). **(e)** Sağ atriyal dokuda TUNEL pozitif apoptotik hücreler (TUNEL x 400). **(f)** Miyositlerde apoptotik nükleer boyanma izlenmemektedir (TUNEL x 400). **(g)** Atriyal fibrilasyonlu olguda, sağ atriyal kardiyomiyositlerde miyokardiyal yapı bozulmuş olup, normal olmayan çekirdekler içeren ve nükleer büyüme gösteren miyositler izleniyor (H-E x 400). **(h)** Sağ atriyal kardiyomiyositlerde kalp kasında nükleer büyüme gösteren miyositler izleniyor (H-E x 400).



Şekil 3. Atriyal fibrilasyon ve kontrol gruplarının apoptotik belirteçler açısından karşılaştırılması. AF: Atriyal fibrilasyon.

yaptıkları araştırmanın sonucunda “Atriyal fibrilasyon, atriyal fibrilasyonu doğurur” tezini ortaya atmışlardır. Hastalığın zamanla oluşan bu değerlendirmesi, yapısal kalp hastalığının progresyonunun, AF'nin devamına izin vermesine bağlı olarak meydana gelen atriyal yeniden biçimlenmeyle (remodeling) açıklanabilir. Elektriksel, yapısal ve kontraktıl olmak üzere üç çeşit atriyal yeniden biçimlenme olduğu öne sürülmüştür.^[12] Atriyal fibrilasyon ile oluşan atriyal yeniden biçimlenme sırasında, farklı zaman dilimlerinde farklı moleküler patolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır. Bu zaman dilimlerinden saniyelerle dakikalar arasında olan ‘kısa dönemde; iyon konsantrasyonu, pompa aktivitesi ve fosforilasyon gibi metabolik değişimler görülmektedir. Saatlerle günler arasında gerçekleşen ‘orta dönem’, gen ekspresyon değişimleri ve kalsiyum down regülasyonu ile karakterizedir. Haftalardan aylara kadar süren ‘uzun dönemin etkileri de-diferansiyasyon ve miyolizis gibi hücresel değişimleri içerir. Son olarak da kalıcı AF'nin dahil olduğu ‘çok uzun dönem’ aylardan yıllara kadar sürer; fibrozis, yağ dejenerasyonu ve hücre ölümü gibi histolojik değişimlerin olduğu geri dönüşümsüz doku hasarı gözlenir.^[11-13] Deneysel izole AF çalışmalarında, fibrilasyonun indüklenmesi sonucunda hücresel volüm artışı, miyolizis, glikojen birikimi, mitokondriyal değişiklik ve kromatin redistribüsyonunu içeren atriyal de-diferansiyasyon bulguları tespit edilmiştir.^[14] Ayrıca yapılan son çalışmalarda atriyal dokuda fibrozisin bulgusu olarak kabul edilen belirteçlerin ameliyat sonrası AF eğilimini artırdığına dair bulgular saptanmıştır.^[15] Bir başka ifadeyle atriyal fibrozisin AF eğilimine neden olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgilerden hareketle apop-

tozisi araştırdığımız çalışma grubunu kalıcı AF’li hastalardan oluşturduk.

Apoptozis, regüle edilebileceği değişik basamakları olan çok adımlı bir hücre ölümü prosesidir. Özellikle Bcl-2 gen ailesi tarafından pro- veya anti-apoptotik protein ekspresyonlarının çeşitli nedenlerle artması/ azalmasına göre apoptozis regüle edilir.^[16] Bu durum, tam diferansiye olmuş kardiyomyositlerin geri dönüşümsüz hücre hasarına yanıt olarak, miyokardiyuma daha çok zarar veren nekrozisin yerine apoptozise yönlendirilebilmesi veya kurtarılabilir hücrelerin gereksiz ölümünün engellenmesi açısından önemli bir özelliktir. Apoptozisin uyarımı veya inhibisyonu; kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hücre hasarlarının olduğu patolojilerin önlenmesi ve tedavisi için yeni ve önemli bir hedef olacaktır.

Kardiyovasküler sistemin normal embriyonik gelişimi sırasında apoptozis yoğun olarak meydana gelirken erişkinlerde apoptozis mekanizmaları, kalpte inaktif halde bulunur.^[1,2] Bunun yanında çeşitli kardiyak ve vasküler hastalıklarda apoptozis mekanizmalarında değişiklikler olduğu gösterilmiştir. Tip-A aort diseksiyonlu hastaların vasküler düz kas hücrelerinde pro-apoptotik Bak proteini ekspresyonunun ve DNA fragmentasyonunun kontrol örneklerine oranla fazla olduğu çalışma grubumuz tarafınca gösterilmiştir.^[17] Afrika’da familial olarak rastlanan progresif kalp bloğunda, Brink Sendromu’nda, Brugada Sendromu’nda ve uzun QT sendromunda sinüs düğümü ve atriyoventriküler düğümde selektif apoptozise bağlı destrüksiyon olduğu gösterilmiştir.^[15-9] Öte yandan kardiyovasküler hastalıklarda AF ile apoptozis arasındaki ilişki irdelenmiştir. Ak ve ark.ları^[18] koroner bypass ameliyatına alınan hastalarda sağ atriyal dokudaki apoptozisin ameliyat sonrası AF gelişiminde bağımsız bir risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. İnsan kalp dokusunda yapılan araştırmalar sonucunda apoptozisin, idiyopatik dilate kardiyomyopati, iskemik kardiyomyopati, aritmojenik sağ ventrikül displazisi ve hipertrofik kardiyomyopati gibi durumlarla ilişkisi olduğu saptanmıştır.^[19,20] Bu gibi hastalıklarda apoptozis düşük yoğunlukta gerçekleşmesine rağmen, kalp yetmezliğinin son dönemlerinde genel olarak kardiyomyosit kaybının apoptozisle gerçekleştiği düşünülmektedir. Yakın zamanda yayınlanan bir çalışmada, kalp yetmezliğinin düzeyi ile pro-apoptotik Bax seviyesi arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir.^[21] Elimizdeki bulgular apoptozisin kalp yetersizliğinde etyolojik bir neden mi yoksa sonuç mu olduğunu tam aydınlatamamaktadır. Ancak, etyolojisi ne olursa olsun tüm kalp yetersizliklerinde apoptozis süreci tetiklenmiştir.^[22] Çalışmamızda kalp yetmezliği belirteci olarak kullanılabilir sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonları (çalışma grubu; 51.1±10.4, kontrol grubu; 52.1±10.1, p=0.79) açısından farklılık izlenmedi.

Öte yandan hastaların NYHA fonksiyonel kapasiteleri (çalışma grubu; 2.5 ± 0.5 , kontrol grubu; 3.2 ± 0.4 , $p=0.49$), sol ventrikül diyastol sonu çapları (çalışma grubu; 51.1 ± 8.4 , kontrol grubu; 49.1 ± 8.6 , $p=0.53$) ve sol ventrikül sistol sonu çapları (çalışma grubu; 32.8 ± 7.6 , kontrol grubu; 32.6 ± 9.7 , $p=0.96$) arasında istatistiksel farklılık kaydedilmedi. Bir başka ifadeyle apoptotik son noktada, elde edilen sonuçları etkileme potansiyeli olan kalp yetmezliği faktörü açısından gruplar arasında farklılık yoktur.

Apoptotik sürece müdahale etmeyi amaçlayan farmakolojik çalışmaların, özellikle kalp yetmezliği ve apoptozis arasındaki ilişkiyi irdelediği gözlenmektedir. Bu çalışmalarda en çok, kalp yetersizliğinde progresif sol ventrikül disfonksiyonunun devam eden kardiyomiyosit kaybına bağlı olduğu hipotezi üzerinde durulmaktadır. Deneysel olarak hipoksi, renin-anjiyotensin sisteminin aktivatörleri (Anjiyotensin-II), serbest oksijen radikalleri, hücrede artmış kalsiyum yükü ve norepinefrinin miyositlerde apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir.^[22] Buna göre Anjiyotensin-II blokerleri ya da ACE (Anjiyotensin converting enzyme) inhibitörü kullanımının apoptozis çalışmalarında gruplar arasında farklı düzeyde olması, elde edilecek sonuçları etkileme potansiyelindedir. Bu bakış açısından hareketle, çalışma ve kontrol grubu arasında ACE/Anjiyotensin-II blokeri kullanımı açısından farklılık kaydedilmedi (çalışma grubunda 8 hasta, kontrol grubunda 10 hasta, $p=0.442$). Öte yandan beta-blokerlerin de iskemiye takiben reperfüzyon öncesinde uygulandıklarında apoptozisi azalttıkları gösterilmiştir.^[20] Beta-bloker, alfa-1 bloker ve antioksidan etkileri olan karvedilol apoptozisi %77 oranında azaltırken non-selektif beta bloker olan propranololde bu oran %39 olarak saptanmıştır.^[20] Bu durumda beta-bloker kullanımının da elde edilen sonuçları etkileme potansiyeli vardır. Çalışmamızda hastaların beta-bloker kullanımı açısından da gruplar arasında farklılık olmadığı tespit edildi (çalışma grubunda yedi hasta, kontrol grubunda 14 hasta, $p=0.69$).

Hücre fizyolojisi ve patolojisindeki temel rolü son yıllarda ortaya çıkan apoptozisin moleküler düzeyde anlaşılması tedavi yaklaşımlarına yeni boyutlar getirecektir. Apoptozisin uyarımı ve inhibisyonu, belirli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde ideal bir yöntem gibi görülmektedir. Ancak klinikte apoptozisten yararlanabilmek için selektif dokularda bu sürecin nasıl başlatılabileceği ve nasıl sonlandırılabilirliğine yönelik yoğun çalışmalara gereksinim vardır. Çalışmadan elde ettiğimiz sonuçlarla AF patogenezinde apoptozisin rolü olduğu düşünülebilir. Bu bilginin üzerinde yapılacak ileri çalışmalar ile sonuçları açısından önemli olan bu ritim bozukluğunun tedavisinde yeni bakış açıları geliştirme potansiyeli gündeme gelebilecektir. Çalışma grubumuzun atriyal fibrilasyonun mole-

küler temellerini araştırmaya yönelik, hasta ile kontrol gruplarının daha iyi homojenize edildiği ve yüksek işlem hacimli moleküler tekniklerin kullanıldığı araştırmaları devam etmektedir. Devam eden ileri araştırmalarımız, 108S375 proje numarasıyla TÜBİTAK tarafından desteklenmektedir.

Çalışmanın sınırlamaları

İlerleyen bilimsel süreç içerisinde hastalıkların patogenezlerinin tanımlanmasında moleküler mekanizmalar ve ultra strüktürel araştırmalar önem kazanmaktadır. Bu çalışmada AF ile apoptozis arasındaki ilişki irdelendi. Çalışmamızda, AF'li olgularda, sağ atriyal kardiyomiyositlerde pro-apoptotik protein ifadelerinde artış eğilimi ve apoptozisin terminal belirteci olan DNA fragmentasyonunda istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edildi. Ancak bu çalışma ile apoptozisin AF'ye yol açtığı sonucuna ulaşılamamaktadır. Atriyal fibrilasyonda ortaya çıkan kronik basınç ve volüm yükünün, sağ atriyal dokuda apoptotik süreci harekete geçirmesi olasılığı vardır. Bir başka ifadeyle bu çalışma AF'li hastaların sağ atriyal dokularında apoptozisin varlığını göstermekle beraber, apoptozis fenomeninin AF'nin altında yatan etyolojik nedenlerle mi yoksa AF sürecinden sonra mı geliştiğinin yanıtını verememektedir. Bu soruya yanıt bulabilmek amacıyla deneysel hayvan modellerine gereksinim vardır. Çalışmanın bir diğer kısıtlaması, doku örneklerinin sağ atriyal dokudan alınmasıdır. Atriyal fibrilasyon, birincil olarak sol atriyum etkileyen ritim sorunudur. Ancak ilerleyen süreç içerisinde artan volüm ve basınç yükü nedeniyle sağ atriyum da patolojik sürece katılmaktadır. Sol atriyal doku örnekleme ve özellikle posteriyor sol atriyal duvardan alınacak biyopsiler ile elde edilecek verilerin ideal olduğu yadsınamaz. Ancak, çalışmamızda sol atriyal örnekleme sadece sol atriyal orijinli tromboembolizmi önlemek amacıyla sol atriyal apendajın bağlanma endikasyonu olan hastalarda gerçekleştirildi. Sol atriyal biyopsileri tüm çalışma grubunda gerçekleştirmek etik nedenlerle mümkün olamamıştır. Sol atriyal örnekleme, KPB sırasında düşük de olsa hava embolisi ve/veya sol atriyal apendajda yerleşmiş trombüsün yerinden oynatılarak tromboemboli riskini artırmaktadır. Bu nedenlerle teknik olarak sol atriyal örnekleme ancak KPB'ye girildikten sonra alınabilmektedir. Kardiyopulmoner bypass'a girildikten sonra alınan sol atriyal doku örneklerinde de, KPB'ye bağlı olarak ortaya çıkan inflamatuvar yanıtın AF üzerine etkileri nedeniyle apoptozise ait bulguları gölgeleme ihtimali vardır. Bu nedenle sol atriyal örnekler üzerinden apoptotik süreç değerlendirilmedi. Sonuç olarak, hastalar arasındaki eşitliği bozmamak amacıyla, apoptozis araştırması tüm hastalarda sağ atriyal doku örneklerinde çalışıldı. Sağ atriyal basınç yükünün

indirekt belirteci olan pulmoner arter basıncı açısından çalışma ve kontrol grupları arasında fark bulunmadığı görüldü. Bu nedenle apoptozis son noktası açısından sağ atriyal doku örnekleme elde edilen sonuçları etkilememektedir.

Teşekkür

Araştırma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi araştırma fonlarından sağlanan bütçeler ile gerçekleştirilmiştir. Araştırma grubu olarak, apoptozis konusundaki bilimsel yorum ve yönlendirileri nedeniyle Doç. Dr. K. Can Akçalı'ya ve Doç. Dr. Hilal Özdağ'a, çalışmanın istatistikî değerlendirme ve yorumlarından dolayı Prof. Dr. Mustafa Kılıçkap'a, doku örneklerinin toplanmasındaki yardımlarından dolayı Kalp ve Damar Cerrahisi ameliyathane hemşirelerine teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

1. Feinberg WM, Blackshear JL, Laupacis A, Kronmal R, Hart RG. Prevalence, age distribution, and gender of patients with atrial fibrillation. Analysis and implications. *Arch Intern Med* 1995;155:469-73.
2. Wolf PA, Abbott RD, Kannel WB. Atrial fibrillation as an independent risk factor for stroke: the Framingham Study. *Stroke* 1991;22:983-8.
3. Rodgers M, McKenna C, Palmer S, Chambers D, Van Hout S, Golder S, et al. Curative catheter ablation in atrial fibrillation and typical atrial flutter: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 2008;12:iii-iv, xi-xiii, 1-198.
4. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
5. Brink AJ, Torrington M. Progressive familial heart block-two types. *S Afr Med J* 1977;52:53-9.
6. Brugada J, Brugada R, Brugada P. Right bundle-branch block and ST-segment elevation in leads V1 through V3: a marker for sudden death in patients without demonstrable structural heart disease. *Circulation* 1998;97:457-60.
7. James TN. Apoptosis in cardiac disease. *Am J Med* 1999; 107:606-20.
8. James TN, St Martin E, Willis PW 3rd, Lohr TO. Apoptosis as a possible cause of gradual development of complete heart block and fatal arrhythmias associated with absence of the AV node, sinus node, and internodal pathways. *Circulation* 1996;93:1424-38.
9. James TN, Terasaki F, Pavlovich ER, Vihert AM. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with the long QT syndrome. *J Lab Clin Med* 1993;122:309-23.
10. Akcali KC, Sahiner M, Sahiner T. The role of bcl-2 family of genes during kindling. *Epilepsia* 2005;46:217-23.
11. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation* 1995;92:1954-68.
12. Schotten U, Duytschaever M, Ausma J, Eijsbouts S, Neuberger HR, Allesie M. Electrical and contractile remodeling during the first days of atrial fibrillation go hand in hand. *Circulation* 2003;107:1433-9.
13. Allesie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kléber AG, Lab MJ, Legato MJ, et al. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation* 2001;103:769-77.
14. Thijssen VL, Ausma J, Borgers M. Structural remodelling during chronic atrial fibrillation: act of programmed cell survival. *Cardiovasc Res* 2001;52:14-24.
15. Sezai A, Hata M, Niino T, Kasamaki Y, Nakai T, Hirayama A, et al. Study of the factors related to atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting: a search for a marker to predict the occurrence of atrial fibrillation before surgical intervention. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009;137:895-900.
16. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003; 426:671-6.
17. Akar AR AC, Durdu S, Aydin IT, Civril F, Tasoş R et al. Aortic vascular smooth muscle cell apoptosis in patients with type-A aortic dissection. *Turkish J Vascular Surg* 2005;14:25-30.
18. Ak K, Akgun S, Tecimer T, Isbir CS, Civelek A, Tekeli A, et al. Determination of histopathologic risk factors for postoperative atrial fibrillation in cardiac surgery. *Ann Thorac Surg* 2005;79:1970-5.
19. Guerra PG, Thibault B, Dubuc M, Talajic M, Roy D, Crépeau J, et al. Identification of atrial tissue in pulmonary veins using intravascular ultrasound. *J Am Soc Echocardiogr* 2003;16:982-7.
20. Haunstätter A, Izumo S. Future perspectives and potential implications of cardiac myocyte apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:795-801.
21. Akyürek O, Akyürek N, Sayin T, Dinçer I, Berkalp B, Akyol G, et al. Association between the severity of heart failure and the susceptibility of myocytes to apoptosis in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Int J Cardiol* 2001;80:29-36.
22. Sabbah HN. Apoptotic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 2000;45:704-12.